

HPLC-MS 法测定猪肉中地西洋等 5 种禁用药物的残留量

张倩勉 (广西-东盟食品药品安全检验检测中心, 广西南宁 530021)

摘要 [目的]建立快速、准确、高灵敏度的测定猪肉中地西洋等 5 种禁用药物残留量的分析方法。[方法]采用高效液相色谱-串联质谱联用法(HPLC-MS),通过不同的离子模式进行猪肉中 5 种禁用药物残留量的测定,其中地西洋、丙酸睾酮、氯丙嗪采用正离子模式,玉米赤霉醇以及己烯雌酚采用负离子模式,并进行多反应检测(MRM)。[结果]试验显示,该方法的线性范围为:3~100 ng/mL,标准曲线线性良好,其回归方程及相关系数分别为地西洋: $Y=27\ 200X-0.009\ 31$, $R=1.000\ 0$;丙酸睾酮: $Y=13\ 800X-0.000\ 147$, $R=1.000\ 0$;氯丙嗪: $Y=0.095\ 1X+0.025\ 7$, $R=0.999\ 9$;玉米赤霉醇: $Y=44\ 100X-0.006\ 58$, $R=1.000\ 0$;己烯雌酚: $Y=0.093\ 4X+0.018\ 8$, $R=0.998\ 9$ 。回收率分别为:地西洋 100.50%~111.30%;丙酸睾酮 73.30%~84.20%;氯丙嗪 70.30%~99.10%;玉米赤霉醇 69.90%~75.30%;己烯雌酚 84.70%~117.70%。最低检出限分别为:地西洋 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$,丙酸睾酮 0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$,氯丙嗪 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$,玉米赤霉醇 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,己烯雌酚 0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。[结论]该方法操作简便、快速,是动物源性食品中地西洋等 5 种禁用药物残留的快速而准确的检测方法。

关键词 高效液相色谱-串联质谱联用;猪肉;禁用药物;残留量;测定

中图分类号 S851.34⁺7 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)25-071-05

Determination of Diazepam and Other Four Kinds of Banned Drugs in Pork by HPLC-MS

ZHANG Qian-mian (Guangxi and Asean Inspection Testing Center For Food and Drug Safety, Nanning, Guangxi 530021)

Abstract [Objective] To establish a rapid, accurate, highly sensitive determination method for diazepam and other four kinds of banned drugs in the pork. [Method] High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS) was used with different ion modes. Residual quantities of five banned drugs in pork were detected. Among them, positive ion mode was used for diazepam, testosterone propionate and chlorpromazine; while negative ion mode was used for zearalanol and diethylstilbestrol. [Result] The linear range of this method was 3-100 ng/mL; the standard curve had good linearity. Their regression equations and *R* values were as follows: diazepam: $Y=27\ 200X-0.009\ 31$ and $R=1.000\ 0$, respectively. Testosterone propionate: $Y=13\ 800X-0.000\ 147$, $R=1.000\ 0$; chlorpromazine: $Y=0.095\ 1X+0.025\ 7$, $R=0.999\ 9$; zearalanol: $Y=44\ 100X-0.006\ 58$, $R=1.000\ 0$; diethylstilbestrol: $Y=0.093\ 4X+0.018\ 8$, $R=0.998\ 9$. Recovery rates were: 100.50% - 111.30% for diazepam, 73.30% - 84.20% for testosterone propionate, 70.30% - 99.10% for chlorpromazine. 69.90% - 75.30% for zearalanol, 84.70% - 117.70% for diethylstilbestrol. The minimum detection limits were: 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for diazepam, 0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for testosterone propionate, 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for chlorpromazine, 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for zearalanol, and 0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for diethylstilbestrol. [Conclusion] This method is rapid, simple, sensitive and accurate, and it is a suitable method for rapid determination of diazepam and other four kinds of banned drugs in the animal derived food.

Key words HPLC-MS; Pork; Banned drugs; Residues; Determination

地西洋是一种中枢神经系统镇静剂,主要用于人和动物镇静、催眠及癫痫的治疗,添加到饲料里可提高动物的生长速度,因此在畜牧业生产中多作为动物生长促进剂。地西洋具有蓄积毒性,当人体长期摄入含有地西洋及其代谢物残留的食物后,肝脏负担加重,头脑昏沉,记忆受损,个别人出现皮疹、白细胞减少及运动神经和肌肉功能受到抑制等种种不良反应,进一步危害到人类的食品安全与身体健康。丙酸睾酮作为一种人工合成的睾酮衍生物,是一种甾类蛋白质同化激素,因其具有提高饲料转化率、促进动物生长、提高产量等作用而被用于水产养殖行业,然而水产品中残留的丙酸睾酮对人体健康存在影响生长发育等很多危害,甚至有潜在的致癌性^[1]。氯丙嗪是吩噻嗪类代表药物,为中枢多巴胺受体的阻断剂,作用于中枢神经系统^[2],常被用作催眠、镇静剂,在运输过程中使用可以明显减少动物的死亡率^[3],主要在肝脏代谢,易产生药物残留,对人们的身体健康造成很大影响^[4]。玉米赤霉醇类化合物属于同化激素的一种,有促进细胞的生长与分化、扩增肌肉、增强骨强度等作用,常被用于畜牧业养殖中,以促进动物生长。玉米赤霉醇有激素作用,通过食物链被人体吸收后,会引起心血管、肝、生殖系统、免疫系统等方面的病变甚至肿瘤。己烯雌酚是一种人工合成的雌激素,

它能促进蛋白质的合成代谢,在养殖业中被用来提高动物日增重和饲料效率,促进禽畜生长。但由于其能引发动物和人的癌症,甚至妊娠期间用药或食用高含量己烯雌酚的食物还会殃及下一代^[5]。

以上药物在我国均已禁止在动物饲养中使用,不得在食品中检出,但仍有一些不法饲养业主受利益驱使而违法使用。因此,研究和开发动物源性食品中禁用药物残留量的检测技术,对于保护食品安全具有重要意义^[6]。

1 材料与方法

1.1 材料 猪肉,市购;地西洋对照品(含量 99.9%)、丙酸睾酮对照品(含量 98.0%)、盐酸氯丙嗪对照品(含量 99.7%)、氯丙嗪-D6(含量 99.7%),中检院;玉米赤霉醇(含量 99%)、己烯雌酚(含量 99.5%);己二烯雌酚-D8(含量 98%);乙酸、甲醇均为色谱纯;水为超纯水。

主要仪器设备:安捷伦-1260 高效液相色谱-4500 QTRAP 质谱仪,美国 AB 公司;XSE205DU 分析天平。

1.2 方法

1.2.1 对照品储备液。准确称取地西洋、丙酸睾酮、盐酸氯丙嗪、玉米赤霉醇、己烯雌酚 5 种对照品,分别置 5 个 10 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得地西洋等 5 种对照品储备液。浓度分别为 1.075 0、1.020 0、0.976 6、0.729 0、1.067 0 mg/mL。

1.2.2 混合对照品工作液。精密量取地西洋、丙酸睾酮、盐

酸氯丙嗪、玉米赤霉醇、己烯雌酚 5 种对照品储备液各 0.1 mL,置同一 100 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀(浓度分别为 1.075 0、1.020 0、0.976 6、0.729 0、1.067 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

1.2.3 内标储备液的制备。精密称取盐酸氯丙嗪 - D6 10.24 mg、己烯雌二酚 - D8 1 mL(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)内标分别置 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度。

1.2.4 混合内标工作液的制备。精密吸取盐酸氯丙嗪内标储备液 0.02 mL、己烯雌二酚 - D8 内标储备液 2 mL 置 100 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得,混合内标工作液约为 200 ng/mL 。

1.2.5 标准曲线。分别吸取上述 5 种混合对照品工作液 0.05、0.10、0.20、0.50、1.00 mL,置 10 mL 量瓶中,再分别加入 1 mL 混合内标工作液,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得标准曲线。

1.2.6 色谱条件。色谱柱:Agilent SB-aq 4.6 mm \times 100 mm, 2.7 μm ;流动相组成:正离子模式中 A 为含 0.1% 甲酸水溶液,B 为 0.1% 甲酸 - 甲醇溶液;负离子模式中 C 为水,D 为乙腈;流速:0.4 mL/min;柱温 35 $^{\circ}\text{C}$;进样量 10 μL 。梯度洗

脱,洗脱程序见表 1。

表 1 流动相洗脱程序

Table 1 Gradient elution program of mobile phase

时间 Time min	流速 Flow rate mL/min	流动相 Mobile phase//%			
		A	B	C	D
0	0.4	95	5	80	20
4	0.4	45	55	2	98
5	0.4	5	95	2	98
8	0.4	5	95	80	20
13	0.4	95	5	80	20
18	0.4	95	5	80	20

1.2.7 质谱条件。

1.2.7.1 正离子模式。离子源:电喷雾离子源;检测方式为多反应监测(MRM);气帘气流速:35 L/min;离子源温度:650 $^{\circ}\text{C}$;碰撞气流速:6 L/min;喷雾电压:5 500 V;辅助气流速:50 L/min;其余质谱条件见表 2。

1.2.7.2 负离子模式。离子源:电喷雾离子源;检测方式:MRM;气帘气流速:35 L/min;离子源温度:550 $^{\circ}\text{C}$;碰撞气流速:6 L/min;喷雾电压:-4 500 V;辅助气流速:50 L/min;其余质谱条件见表 2。

表 2 地西洋等 5 种禁用药物残留量检测的质谱条件

Table 2 The mass spectrometry condition for diazepam and other four kinds of banned drugs

分析物 Analyte	模式 Mode	母离子/子离子 Parent ion/daughter ion(m/z)	DP	EP	CE
地西洋 Diazepam	正离子	285.2/193	80	10	40
		285.2/154	80	10	40
丙酸睾酮 Testosterone propionate	正离子	345.4/97.1	80	10	25
		345.4/109.1	80	10	25
氯丙嗪 Chlorpromazine	正离子	319.1/86.1	80	10	25
		319.1/58.2	80	10	65
玉米赤霉醇 Zeranol	负离子	321/277.2	-80	-10	-30
		321/303.1	-80	-10	-30
己烯雌酚 Diethylstilbestrol	负离子	267/250.9	-80	-10	-40
		267/237	-80	-10	-40
酸氯丙嗪 - D6 Winter min-D6	正离子	325.1/91.8	80	10	31
己烯雌二酚 - D8 Dienestrol-D8	负离子	275/259	-80	-10	-36

1.2.8 样品处理。

1.2.8.1 供试品溶液制备。取该品 2 g,置 50 mL 离心管中,加入 0.2 mL 内标工作液,8 mL 乙酸铵缓冲液,高速均质 30 s,加入 30 μL β -葡萄糖苷醛苷酶-芳基硫酸酯酶,涡旋混匀 30 s,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡 12 h。取出样品静置,使其温度降至室温。加入 15 mL 3% 氨水 - 乙腈溶液,5.0 g 无水硫酸钠,涡旋 1 min 后,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、9 500 r/min 离心 5 min,收集上清液于另一 50 mL 离心管。剩余部分重新加入 15 mL 3% 氨水 - 乙腈溶液,旋紧螺旋盖,室温下平置于水平振荡器,振荡提取 10 min,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、9 500 r/min 离心 5 min,吸取上清液层溶液,合并 2 次提取有机相,待净化。

一次性全部将 QuEChERS 吸附剂(100 mgPSA + 40 mg C_{18} + 600 mg 无水硫酸镁)加入样品提取液中,旋紧螺旋盖,高速螺旋 1 min,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、9 500 r/min 离心 5 min。吸取所有有机相溶液,在减压旋转蒸发装置上于 42 $^{\circ}\text{C}$ 蒸发至近干。加入 2 mL 的 10% 乙腈 - 水溶液溶解残渣,涡旋混合 1 min,

过 0.22 μm 滤膜。滤液供液相色谱 - 质谱仪测定。

1.2.8.2 加标回收率试验。称取空白样品 2 g,9 份,分成 2 组,1~3 份为第 1 组,4~9 份为第 2 组。在第 1 组中,分别加入 0.2 mL 曲线 5 溶液以及 0.2 mL 混合内标工作液,第 2 组中分别加入 1 mL 曲线 5 溶液以及 0.2 mL 混合内标工作液,从“8 mL 乙酸铵缓冲液”起,其余步骤同供试品溶液的制备。

1.2.8.3 检出限溶液制备。称取空白样品 2 g,置 50 mL 离心管中,加入 0.1 mL 曲线 5 溶液以及 0.2 mL 混合内标工作液,从“8 mL 乙酸铵缓冲液”起,其余步骤同供试品溶液的制备。

1.2.8.4 样品测定方法。将处理好的待测液放入自动进样器的样品盘上,进样器自动进样 10 μL ,数据采集采用 Analyst Software 工作站进行采集处理,采用 Quantitative Analysis 软件进行数据处理,使用外标法进行数据分析,得出样品溶液中各种分析物的质量浓度。再根据以下公式得出检测结果。结果计算用公式(1),回收率计算用公式(2),检出限计算用公式(3):

$$W = C \times V / M \quad (1)$$

$$\text{回收率}(\%) = \text{测得量} \times 100 / \text{加标量} \quad (2)$$

$$\text{检出限}(\mu\text{g}/\text{kg}) = \text{进样浓度} \times \text{稀释倍数} \times 3 / \text{取样量} / \text{信噪比} \quad (3)$$

式中, W 为样品中各分析成分的含量($\mu\text{g}/\text{kg}$); C 为测得浓度(ng/mL); V 为稀释倍数; M 为样品取样量(g)。

2 结果与分析

2.1 质谱与色谱条件的选择 将含有 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的各种分析

物的对照品混合溶液在正离子和负离子模式下进行全扫描, 找到最佳的电离模式。结果显示, 地西洋、丙酸睾丸、氯丙嗪在正离子模式下响应较强, 玉米赤霉醇和己烯雌酚在负离子模式下响应较强, 再分别在正离子和负离子模式下, 进行碰撞能量的优化。在同一分析物中, 以响应高的离子对作为定量离子。质谱条件见表 2。不同模式下, 采用不同的流动相, 并采用梯度洗脱, 使目标化合物能更好地与其他干扰物质分离, 结果见图 1、图 2。

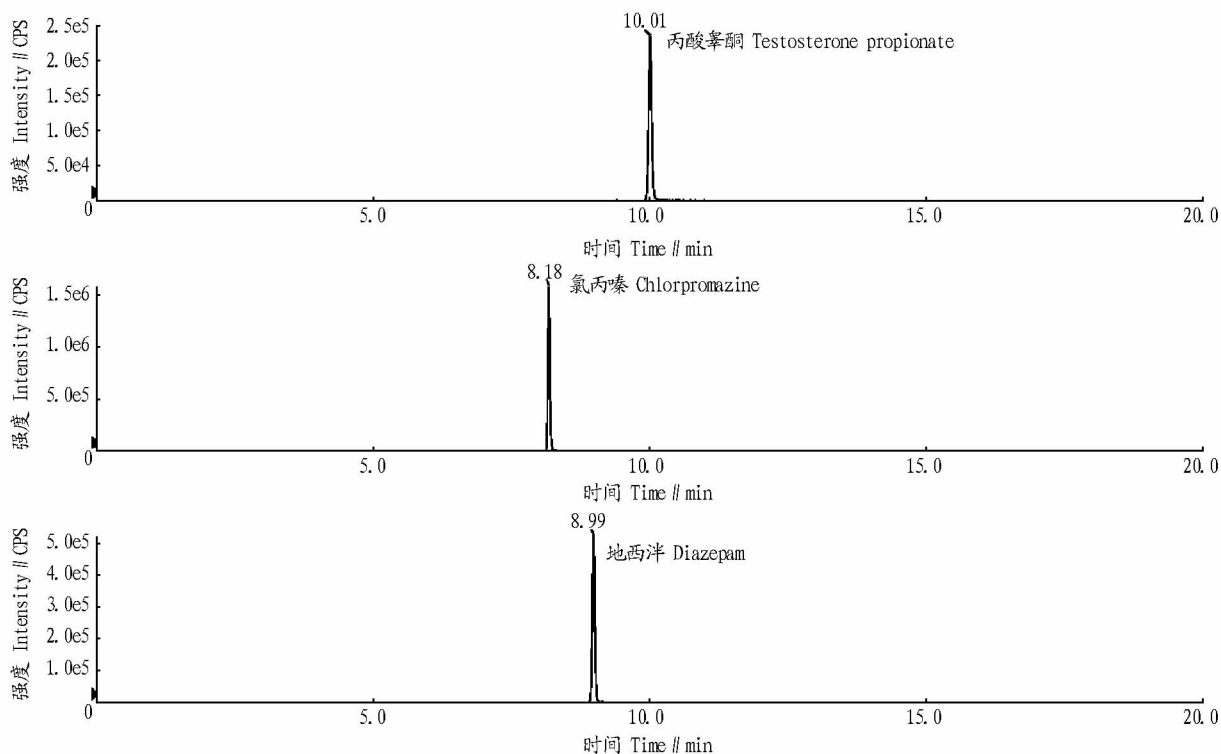


图 1 正离子模式下各化合物的图谱

Fig. 1 The map of three compounds in positive ion mode

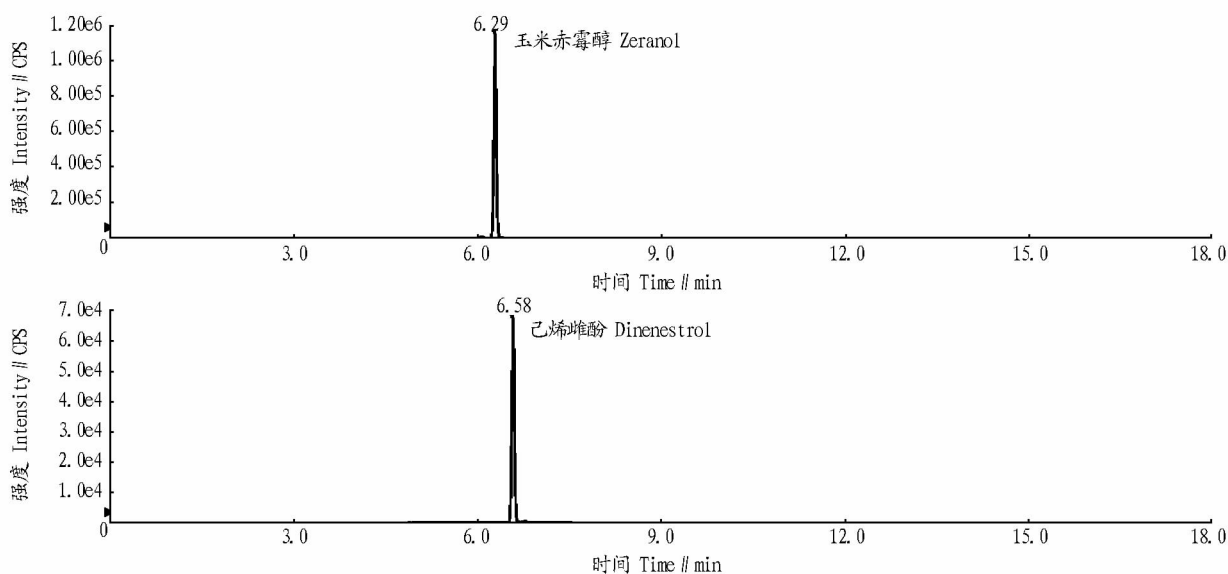


图 2 负离子模式下各化合物的分离情况

Fig. 2 Isolation of chemical compounds in positive ion mode

2.2 线性关系 将标准品曲线注入液相质谱联用仪,以峰面积为(Y)轴,相对质量浓度为(X)轴建立标准曲线,并求出回归方程,结果见表3。结果显示,该方法的线性范围为3~100 ng/mL,标准曲线线性良好,其回归方程及相关系数见表3。

2.3 回收率及精密度结果 回收率试验结果表明,添加不同浓度的各分析物,地西洋回收率在100.50%~111.30%,RSD值为1.22%~6.67%;丙酸睾酮回收率在73.30%~84.20%,RSD值为5.28%~5.52%;氯丙嗪回收率在70.30%~99.10%,RSD值为2.01%~2.60%;玉米赤霉醇回收率在69.90%~75.30%,RSD值为3.10%~4.40%;己烯雌酚回收率在84.70%~117.70%,RSD值为2.57%~

3.84%。结果见表4。

表3 各分析成分线性关系和相关系数

Table 3 Linear relationship and correlation coefficient of the analysis components

化合物 Chemical compound	线性方程 Linear equation	相关系数 Correlation coefficient (R)
地西洋 Diazepam	$Y = 27\ 200X - 0.009\ 310$	1.000 0
丙酸睾酮 Testosterone propionate	$Y = 13\ 800X - 0.000\ 147$	1.000 0
氯丙嗪 Chlorpromazine	$Y = 0.095\ 1X + 0.025\ 700$	0.999 9
玉米赤霉醇 Zeranol	$Y = 44\ 100X - 0.006\ 580$	1.000 0
己烯雌酚 Diethylstilbestrol	$Y = 0.093\ 4X + 0.018\ 800$	0.998 9

表4 各成分的回收率及精密度结果

Table 4 The results of recovery rate and precision of each component

化合物 Chemical compound	水平 Level	加入量 Added amount //ng	测的量 Measured amount//ng	回收率 Recovery rate//%	均值 Mean %	RSD %	
地西洋 Diazepam	回收 1-1	21.50	24.16	112.40	111.30	1.22	
	回收 1-2	21.50	24.02	111.70			
	回收 1-3	21.50	23.60	109.80			
	回收 2-1	107.50	118.50	110.20			
	回收 2-2	107.50	113.30	105.40	100.50		
	回收 2-3	107.50	98.12	91.30			
	回收 2-4	107.50	103.20	96.00			
	回收 2-5	107.50	108.10	100.60			
丙酸睾酮 Testosterone propionate	回收 2-6	107.50	106.90	99.40	84.20	5.28	
	回收 1-1	20.40	18.19	89.20			
	回收 1-2	20.40	16.94	83.00			
	回收 1-3	20.40	16.43	80.50			
	回收 2-1	102.00	73.64	72.20			73.30
	回收 2-2	102.00	77.64	76.10			
	回收 2-3	102.00	80.98	79.40			
	回收 2-4	102.00	71.60	70.20			
氯丙嗪 Chlorpromazine	回收 2-5	102.00	69.58	68.20	99.10	2.01	
	回收 2-6	102.00	75.06	73.60			
	回收 1-1	19.53	19.76	101.20			
	回收 1-2	19.53	19.34	99.00			
	回收 1-3	19.53	18.99	97.20			
	回收 2-1	97.66	69.16	70.80			70.30
	回收 2-2	97.66	71.88	73.60			
	回收 2-3	97.66	66.72	68.30			
回收 2-4	97.66	68.56	70.20				
玉米赤霉醇 Zeranol	回收 2-5	97.66	67.56	69.20	75.30	4.40	
	回收 2-6	97.66	68.04	69.70			
	回收 1-1	14.58	11.31	77.50			
	回收 1-2	14.58	10.43	71.50			
	回收 1-3	14.58	11.22	77.00			
	回收 2-1	72.90	50.40	69.10			69.90
	回收 2-2	72.90	53.24	73.00			
	回收 2-3	72.90	48.60	66.70			
回收 2-4	72.90	50.32	69.00				
己烯雌酚	回收 2-5	72.90	51.90	71.20	117.70	3.10	
	回收 2-6	72.90	51.24	70.30			
	回收 1-1	21.34	25.94	121.60			

接下表

续表 1

化合物 Chemical compound	水平 Level	加入量 Added amount (ng)	测的量 Measured amount//ng	回收率 Recovery rate//%	均值 Mean %	RSD %
Diethylstilbestrol	回收 1-2	21.34	25.64	120.10	84.70	2.57
	回收 1-3	21.34	23.76	111.30		
	回收 2-1	106.70	91.40	85.70		
	回收 2-2	106.70	88.20	82.70		
	回收 2-3	106.70	87.04	81.60		
	回收 2-4	106.70	90.58	84.90		
	回收 2-5	106.70	93.08	87.20		
	回收 2-6	106.70	92.00	86.20		

2.4 样品检测结果及方法检出限 按照试验方法对样品进行前处理,然后进样分析。地西洋、丙酸睾酮、氯丙嗪采用正离子模式,玉米赤霉醇以及己烯雌酚采用负离子模式,根据标准曲线,氯丙嗪及己烯雌酚通过内标法,其他化合物通过

外标法对结果进行计算,结果显示,所检测的猪肉样品中,未检出地西洋等 5 种禁用药物。同时,在该试验条件下,在空白样品中添加标准溶液进行测定,以质谱仪 3 倍信噪比计算目标物组分的检出限,结果见表 5。

表 5 各化合物的检出限结果

Table 5 The results of detection limit of various compounds

名称 Name	进样浓度 Sampling concentration ng/mL	取样量 Sampling volume//g	稀释倍数 Dilution ratio	信噪比 Signal-to- noise ratio//S/N	检出限 Detection limit// $\mu\text{g}/\text{kg}$	修约 Round off $\mu\text{g}/\text{kg}$
地西洋 Diazepam	5.375	2.00	2	53.7	0.300 28	0.4
丙酸睾酮 Testosterone propionate	5.100	2.00	2	29.6	0.516 89	0.6
氯丙嗪 Chlorpromazine	4.883	2.00	2	60.3	0.242 94	0.3
玉米赤霉醇 Zeranol	3.645	2.00	2	25.6	0.427 15	0.5
己烯雌酚 Diethylstilbestrol	5.335	2.00	2	20.5	0.780 73	0.8

3 结论

该试验建立的猪肉中地西洋等 5 种禁用药物残留量的分析方法,地西洋、丙酸睾酮、氯丙嗪在正离子模式下响应高,而玉米赤霉醇以及己烯雌酚在负离子模式下响应高,通过同时采用正负离子模式进行多反应监测,能很好地将猪肉中 5 种禁用药物分离出来。结果显示,标准曲线线性良好,回收率高,检出限低。该方法操作简便、快速,是动物源性食品中地西洋等 5 种禁用药物残留的快速而准确的检测方法。

参考文献

[1] 李俊锁,邱月明,王超. 兽药残留分析[M]. 上海:上海科学技术出版社,

2002;578-633.

- [2] 杨晓云,王立世,莫金垣,等. 毛细管电泳安培法同时检测异丙嗪和氯丙嗪[J]. 分析化学,1999,27(8):991.
- [3] 陈杖榴. 兽医药理学[M]. 2 版. 北京:中国农业出版社,2002:10-158.
- [4] 范盛先,黄玲利,袁宗辉,等. 猪肾脏中氯丙嗪和异丙嗪残留检测方法的建立[J]. 中国兽医学报,2005,25(4):412.
- [5] WOZNIAK B, WOJTON B. Bulletin of the veterinary institute in pulawy [J]. The journal of national veterinary research institute in pulawy, 1996, 40(1):55-59.
- [6] 国家质量监督检验检疫总局. 出口动物源食品中多类禁用药物残留量检测方法 液相色谱-质谱质谱法:SN/T 3235—2012[S]. 北京:中国标准出版社,2013.

名词解释

1 **总被引频次** 指该期刊自创刊以来所登载的全部论文在统计当年的统计刊源中被引用的总次数。该指标反映了该期刊在学术交流中总体被使用和受重视的程度,是文献计量中的一个基础性指标。

2 **影响因子** 指某期刊前两年发表的论文在统计当年的被引用总次数与该期刊在前两年内发表的论文总数之比。这是一个国际上通行的传统评价指标,又可称作 2 年影响因子(IF2)。计算公式为:

$$\text{影响因子 (IF2)} = \frac{\text{该期刊前两年发表论文在统计当年被引用的总次数}}{\text{该期刊前两年发表论文总数}}$$

3 **5 年影响因子** 某一期前五年发表的论文在统计当年的被引用总次数与该期刊在前五年内发表的论文总数之比。计算公式为:

$$\text{5 年影响因子 (IF5)} = \frac{\text{该期刊前 5 年发表论文在统计当年被引用的总次数}}{\text{该期刊前 5 年发表论文总数}}$$

IF5 反映了期刊在 5 年内的平均学术影响力,可作为 2 年影响因子(IF2)的参照。